

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra pěstivařství



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Polymorfismus mikrosatelitů u vybraných odrůd brambor

Knihovna JU - ZF



3114703748

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor:

Jaroslav Motis

České Budějovice
2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jaroslav MOTIS**
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství - sp. gen. inž. a šlechtění rostlin**
Název tématu: **Polymorfismus mikrosatelitů u vybraných odrůd brambor**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úvod: Stručný nástin významu tématu a cíl práce. Cílem diplomové práce bude posouzení vhodnosti techniky mikrosatelitů pro účely hodnocení genetické variability u vybraného souboru brambor, jejich využití pro účely popisu a identifikace odrůd.

Literární přehled: zhodnocení významu molekulárních markerů ve šlechtění brambor a pro účely popisu a identifikaci genotypů

Materiál a metody: popis metodiky SSR analýzy, charakteristika analyzovaných odrůd

Výsledky: vyhodnocení primárních elektroforetických dat, uspořádání do tabulek a grafů, databáze spekter.

Diskuze: porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených, poznatků a doporučení

Závěr: přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývajících z řešené problematiky

Seznam použité literatury: v abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce

Rozsah práce: 40-50 stran
Rozsah příloh: 5 grafů
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Hoelzel, A.R. (1992): Molecular Genetic Analysis of Populations. - IRL Press at Oxford Univ. Press, New York
Gustavo Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley - Sons, Inc., New York.
Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby

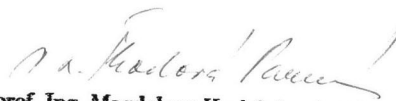
Datum zadání diplomové práce:

28. března 2003

Termín odevzdání diplomové práce:

28. dubna 2006

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 18
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

děkanka

L.S.

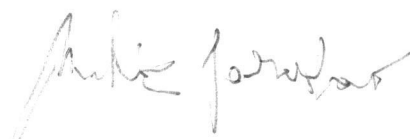

doc. Ing. František Klimeš, CSc.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 28. března 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Polymorfismus mikrosatelitů u vybraných odrůd brambor“ vypracoval samostatně a uvedl v ní veškerou literaturu a ostatní zdroje, které jsem použil.

V Českých Budějovicích,



Motis Jaroslav

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Ing. Vladislavu Čurnovi, PhD. za metodické a odborné vedení a Ing. Aleně Novákové za cenné rady a poskytnuté zázemí pro tvorbu této práce.

Motis Jaroslav

OBSAH	
1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Genetický polymorfismus	3
2.2 Charakteristika genetických markerů	3
2.2.1 Molekulární DNA markery	4
2.2.2 Rozdělení DNA markerů	4
2.2.2.1 Dle využití při mapování genomu	4
2.2.2.2 Dle charakteru polymorfismu	5
2.3 Repetitivní sekvence	5
2.3.1 Charakteristika repetitivních sekvencí	5
2.3.2 Vznik mikrosatelitů	7
2.3.3 Struktura mikrosatelitů	8
2.3.4 Funkce mikrosatelitů	8
2.3.5 Vlastnosti mikrosatelitů	9
2.3.6 Mutace mikrosatelitních lokusů	9
2.3.7 Použití mikrosatelitů	9
2.4 Přehled metod pro testování polymorfismu DNA	10
2.4.1 Charakteristika nejdůležitějších metod pro detekci polymorfismu na úrovni DNA	11
3. Popis odrůd	16
3.1 Odrůdy velmi rané	16
3.2 Odrůdy rané	18
3.3 Odrůdy polorané	20
3.4 Odrůdy polopozdní až pozdní	22
4. Materiál a metody	24
4.1 Izolace hlízové šťávy	24
4.2 Izolace DNA	24
4.3 Složení reakční směsi PCR	25
4.4 Separace PCR produktu	26
4.5 Digitální obrazová analýza gelů a hodnocení dat	26
4.6 Clusterová analýza	26
4.7 Statistické zpracování dat	26

5. Výsledky	27
6. Diskuse	31
7. Závěr	33
8. Seznam literatury	34
9. Seznam použitých zkratk	40

1. Úvod

Šlechtění rostlin bylo a stále je velmi dlouhodobý proces, náročný na finance, na prostor, na čas a zodpovědný a cílevědomý přístup šlechtitelů. Dobrý výsledek jejich práce, kterým je kvalitní, odolná a výnosná odrůda, nemusí být vždy předem zaručen. Na tento proces působí řada vnitřních i vnějších faktorů. Mezi vnější faktory řadíme přírodní podmínky nebo vlivy ročníku, výskyt chorob a škůdců i velký vliv člověka - šlechtitele, který záměrně vybírá vhodné rodičovské rostliny. Do vnitřních faktorů počítáme i takové jevy, jako jsou vzájemná nekřížitelnost rodičovských komponent. Role šlechtitele je významná, neboť na jeho spolehlivosti, na dobrém úsudku a předvídavosti závisí, zda správně odhadne, jakým směrem se budou vyvíjet požadavky spotřebitelů a zpracovatelů na šlechtěnou plodinu.

Náročnost šlechtitelské práce spočívá především v dlouhodobé systematické práci s rozsáhlým souborem jedinců. Po dlouhé období mohli šlechtitelé vybírat rostliny pouze na základě jejich fenotypového projevu, postupně se do tohoto procesu začaly zapojovat i nové vědecké poznatky. Zkoumaly se obsahy různých důležitých látek v rostlině a možnosti jejich zvýšení nebo snížení. Stále však nedocházelo k výraznému zkrácení či zjednodušení celého procesu šlechtění. V poslední době jsou používány analytické metody, které odhalují genotyp rostliny, a tím výrazně napomáhají jak k vědecké tak i k šlechtitelské činnosti. Jejich využití na šlechtitelské úrovni spočívá ve vyhledávání nových molekulárních markerů, které jsou oproti morfologickým nezávislé na vnějších podmínkách prostředí a to poskytuje šlechtitelům nové možnosti. Například výhodou molekulárních i biochemických markerů bývá možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu už v raných stádiích vývoje rostlin. Tento způsob testování je nedestruktivní, tj. pro analýzu se používají jen malé části rostlinné tkáně a je možné rostliny testovat už v klíčovém stavu. Rostlina pak může dále růst a poskytovat např. semena pro namnožení vybraného materiálu. Použití molekulárních markerů má oproti morfologickým výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků. Využití molekulárních markerů ve šlechtění znamená mnohem časnější a snazší identifikaci vhodných materiálů pro další šlechtění a tím i výrazné zkrácení a celkové zlevnění šlechtitelského procesu, i když samotná analýza mezi nejlevnější nepatří.

Cílem předkládané práce je ověření vhodnosti analýzy mikrosatelitů pro hodnocení polymorfismů a identifikaci vybraných odrůd konzumních brambor.

2. Literární přehled

V současné době je v České republice registrováno 150 odrůd brambor (stav roku 2005), z nichž přes 70 % jsou produkty zahraničních (evropských) šlechtitelských subjektů. Celková plocha množitelských porostů brambor byla v minulém roce cca 5 000 ha.

Klasická morfometrická charakterizace odrůd přestává být v tomto objemu registrovaných odrůd účinná, obzvláště na úrovni hlíz. Potřeba identifikovat konkrétní odrůdu na úrovni hlíz je přitom nejdůležitější, hlavně z obchodního hlediska. Platný zákon č. 110 / 1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a vyhláška na něj navazující (Vyhláška MZe č. 332 / 1997 Sb.) vyžadují u konzumních brambor deklaraci odrůdy a odrůdové čistoty při obchodním styku.

Biochemické markery na úrovni bílkovin (BBM – biochemické bílkovinné markery) - elektroforetická spektra rozpustných hlízových bílkovin a isoenzymů jsou doporučována pro identifikaci a certifikaci odrůd brambor, ověřování odrůdové pravosti a kontrolu čistoty sadby hlavně pro svou jednoduchost provedení.

Přestože jsou na jedné straně bílkovinná spektra prezentována jako vhodná pro účel identifikace odrůd brambor, na straně druhé mají určité nedostatky. Za hlavní nedostatky jsou považovány nižší úroveň polymorfismu a neúplně spolehlivý konzervatismus (obecná možnost vlivu prostředí na expresi bílkovin, posttranslační úpravy). Jako perspektivní se jeví pro účel odrůdové identifikace využití polymorfismu přímo na úrovni DNA. Obecně lze říci, že DNA techniky mají v porovnání s bílkovinnými spektry větší schopnost vzájemně rozlišit genotypy rozsáhlých souborů. Na druhé straně jsou tyto techniky, oproti BBM, náročnější z hlediska finančního (pro účel rutinní aplikace při kontrole odrůdové pravosti obchodovaných brambor) a technického vybavení.

Pro studium a charakterizaci genotypů brambor je doposud nejvíce používanou technikou RAPD. Waugh *et al.* (1992) použili techniku RAPD při detekci genové introgrese u druhu *Solanum tuberosum*. RAPD markery byly rovněž použity při určování genetické diverzity brambor (Demeke *et al.*, 1996; Paz and Veilleux, 1997) a při hodnocení genetické variability mezi vnitrodruhovými somatickými hybridy (Gavrilenko, 1999). Pro charakterizaci odrůd brambor použili techniku RAPD například Demeke *et al.* (1993), Hosaka *et al.* (1994) a Sosinski a Douches (1996).

Kim *et al.* (1998) charakterizovali soubor 12 odrůd brambor technikou AFLP. V této studii použili 7 primerových kombinací se třemi selektivními nukleotidy na obou

primerech. Z 466 generovaných pruhů bylo 88 % polymorfních mezi odrůdami zvoleného souboru. Van der Voort *et al.* (1998) vytvořili on-line katalog AFLP markerů (733 chromozómově specifických AFLP markerů) pokrývající celý genom bramboru.

Užití mikrosatelitů (SSR) pro fylogenetické a fingerprintové analýzy u brambor studovali Ashkenazi *et al.* (2001) a potenciál techniky PCR-ISSR pro fingerprinting odrůd brambor posuzovali Prevost a Wilkinson (1999). McGregor *et al.* (2000) porovnávali navzájem možnosti využití molekulárních markerů - RAPD, AFLP, ISSR a SSR - pro fingerprinting odrůd brambor na modelovém souboru 39 odrůd. Zjistili, že všechny techniky jsou schopné rozlišit všechny odrůdy tohoto souboru. Nicméně jednotlivé techniky se lišily hodnotou tzv. genotypového indexu, který blíže charakterizuje možnosti jednotlivých technik (pro AFLP byla hodnota GI = 1,0; RAPD GI = 0,53; ISSR GI = 0,47 a pro SSR GI = 0,36).

Možnost rychlé a přesné identifikace jednotlivých odrůd brambor je důležitá ve šlechtitelských programech, množení i při komerčním pěstování brambor. Využití molekulárních markerů ve šlechtění brambor nabízí nové možnosti pro selekci žádaných genotypů, urychlení a zefektivnění šlechtitelského procesu.

2.1 Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus je výskyt dvou a více alternativních alelických forem určitého genu v populaci s frekvencí nad 1% (Rosypal *et al.*, 1989).

Znak tvořený více fenotypovými formami nazýváme polymorfním, zatímco znak tvořený jen jednou formou je označován jako monomorfní. Genetický polymorfismus tvoří významnou složku vnitropopulační genetické variability, která umožňuje přežití populace a její vývoj.

2.2 Charakteristika genetických markerů

Genetický marker, jinak nazývaný též signální gen, je označení pro určitý znak, který se jasně fenotypově projevuje a je jednoduše dědičně založen. Pro označení jako marker musí být splněna podmínka spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními nebo kvalitativními znaky (Čurn a Sáková, 1996). V současné době jsou využívány genetické markery na úrovni biochemických markerů (proteinové markery – isoenzymy a zásobní bílkoviny, mastné kyseliny, sekundární metabolity) a molekulárních DNA markerů (Graman *et al.*, 1999).

2.2.1 Molekulární DNA markery

DNA markery jsou markery na úrovni molekuly DNA. Umožňují jednoduše určovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markerovací systémy jsou založeny na polymorfismu v sekvencích DNA u analyzovaných jedinců (populací) (Čurn, 1998). Je prokázáno, že v průměru 50% lokusů rostlinných druhů je polymorfních (Chloupek, 1995).

Sekvence DNA se v genomu mohou vyskytovat jako jedinečné sekvence (*single copy*), jako středně nebo vysoce repetitivní (opakující se) sekvence s rozličnou funkcí a významem, tj. kódující, regulační a nekódující sekvence. Úroveň variability je určována řadou faktorů, např. frekvencí mutací, frekvencí rekombinací, různými formami selekce. V polymorfních regionech se můžeme setkat se dvěma typy variability – s jednoduchými substitucemi nukleotidů nebo variabilitou v počtu tandemových opakování v repetitivních lokusech (VNTR - *Variable Number Tandem Repeats*). Zdrojů variabilních DNA oblastí je více. Studium je však zaměřeno na rDNA (ribosomální DNA), tDNA (tRNA), minisatelity (repetitivní sekvence 10 – 300 bp dlouhé lokalizované poblíž telomér), mikrosatelity (1-4 bp dlouhé tandemově opakované nukleotidové sekvence). Kromě tohoto typu polymorfní DNA jsou v genomu obsaženy náhodné genomové sekvence většinou používané v RFLP, RAPD a AFLP analýzách (Bachmann, 1992). Molekulárně genetické metody používané ve šlechtění se využívají pro identifikaci genetických markerů, konstrukci genetických map a k lokalizaci genů.

2.2.2 Rozdělení DNA markerů

DNA markery se dělí podle několika kritérií:

2.2.2.1 Dle využití při mapování genomu:

I. typ – kódující exprimované geny, které mohou být geny pro QTL (lokusy pro kvantitativní znaky). Mají nízkou hladinu polymorfismu a jsou málo využitelné pro studium diversity rodin a populací. Významné je jejich využití v komparativním, srovnávacím mapování.

II. typ – vysoce variabilní sekvence DNA, především mikrosatelity a minisatelity. Vlivem vysokého stupně polymorfismu jsou mikrosatelity vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství, dále jsou základem pro vazbové mapování genů. Tyto markery nemají přímo vliv na variabilitu znaku, ale mohou být ve vazbě s QTL.

III. typ – polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP – *single nucleotide polymorphism*), mohou ležet uvnitř kódujících genů, častěji se však nacházejí v nekódujících intronech, nebo v intergenových oblastech. Využívají se pro populační studie. V genomu se vyskytují každých 500 – 1000 bp (Rosypal *et al.*, 1989).

2.2.2.2 Dle charakteru polymorfismu:

I. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

II. Polymorfismus v délce sekvence a to metody AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) a SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*). Tato skupina zahrnuje mikrosatelity (STR – *Short Tandem Repeats*), minisatelity (VNTR – *Variable Number Tandem Repeats*) a vzácně se vyskytující delece nebo inserce způsobené např. transpozomy.

III. Polymorfismus jednotlivých nukleotidů *SNP*. Jde o bodové mutace, které lze detekovat jako RFLP. Neexistuje-li rozpoznávací místo pro restriktazu, je možno použít DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), nebo SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), případně pouze sekvenování. Většinou se jedná o bialelické markery (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

Většina produkčních znaků jsou kvantitativní znaky, které jsou řízeny mnoha geny, mají kontinuální proměnlivost a jsou značně ovlivněny prostředím. Kvantitativní znak, respektive geny kvantitativního znaku jsou lokalizovány na více chromozómech a jsou známy jako „lokusy kvantitativních znaků“ (Příbyl, 1995).

Mikrosatelitní alely, stanovené molekulárně genetickými metodami, se tak mohou stát markery pro QTL. Kvalita mikrosatelitního markeru je dána hodnotou heterozygotnosti a polymorfním informačním obsahem v dané populaci (Ciampolini *et al.*, 1995).

2.3 Repetitivní sekvence

2.3.1 Charakteristika repetitivních sekvencí

Repetitivní DNA je součástí všech eukaryontních genomů a může zaujímat i více než 90% celkového genomu (Koblížková, 1998).

Podle způsobu uspořádání se repetitivní sekvence rozdělují na:

- Rozptýlené
- Tandemové

Rozptýlené sekvence jsou rozptýleny na mnoha místech genomu. Tandemové repetice jsou tvořené opakujícími se motivy dvou až tisíců bází uspořádaných za sebou. Většina tandemových repetic je tvořena nekódující DNA a dělíme je podle délky, počtu kopií základního motivu a lokalizací v genomu na satelity, minisatelity a mikrosatelity.

Pro tandemově repetitivní DNA se používá též historický termín satelitní DNA (Watson, 1980).

Satelity

Satelity jsou repetitivní sekvence lokalizované na jednom až několika lokusech o délce 500 – 10 000 bp, a počtem opakování 1 000 – 10 000 000 v každém lokusu. Vyskytuje se často v heterochromatinových oblastech to zejména v oblastech centromer chromozómů.

Minisatelity

Minisatelity jsou repetitivní sekvence o délce 10 – 200 bp, a počtem opakování 200 – 1 000 v každém lokusu, počtem lokusů několik set až tisíc (v každém lokusu může být repetice poněkud pozměněna). Vyskytují se na mnoha místech genomu, hlavně však v oblasti telomér (Jeffereys *et al.*, 1994).

Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou repetitivní sekvence o délce 2 – 4 (6) bp a počtem opakování 4 – 100 v každém lokusu a počtem lokusů 1 000 – 100 000. Vyskytují se na mnoha místech genomu v náhodně roztroušených lokusech i na transkripčních jednotkách (Tautz *et al.*, 1986).

Minisatelity a mikrosatelity se často vyskytují ve stejných lokusech a navzájem se prostupují (Armour *et al.*, 1994).

Mikrosatelity (STRs – *Short Tandem Repeats*, SSRs – *Simple Sequence Repeats*) jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících mono-, di-, tri-, nebo tetranukleotidových motivů. Vyskytují se ve všech eukaryotických genomech, jejich funkce je však stále diskutabilní. Významnou vlastností je vysoký stupeň polymorfismu způsobený variabilním počtem tandemových repetic (10 – 30) (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Mikrosatelity byly objeveny počátkem 80. let 20. století. Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu, vykazují vysokou úroveň polymorfismu (Weber *and* May, 1989) a nachází se ve všech dosud sledovaných genomech eukaryotních a také v některých genomech prokaryot (Tautz *et al.*, 1986). Pro jejich vlastnosti jsou proto vhodným nástrojem pro konstrukci genomových map a používají se také v oblasti populační genetiky a molekulární evoluce (Refseth *et al.*, 1997).

2.3.2 Vznik mikrosatelitů

Sekvence mikrosatelitů mohly vzniknout nahromaděním bodových mutací v jednotlivých genech. Tak bylo možné vysvětlit odlišnosti mikrosatelitů v různých evolučních liniích (Gordon, 1997). Důvody a mechanismy expanze a delece nejsou známy. Při nadměrné expanzi mikrosatelitních úseků může být energetická zátěž spojená s replikací natolik významná, že by ve své podstatě znevýhodňovala organismus v konkurenci s ostatními jedinci populace. Příčinou prodlužování mikrosatelitních sekvencí je zřejmě tvorba neobvyklých sekundárních struktur během replikace (Kang *et al.*, 1995).

Délkové mutace mikrosatelitních sekvencí lze vysvětlovat několika způsoby:

I. Sklouznutím řetězce DNA během replikace (*Slipped – Strand Mismatching*). Při replikaci opožďujícího se řetězce se vytvoří v úseku s trinukleotidy vlásenka (Levinson a Gutman, 1987). Dojde – li k tomuto jevu na úseku Okazakiho fragmentu, následuje expanze trinukleotidů (Kang *et al.*, 1995). Četnost těchto dějů je různá. Inzerce nové kopie zvyšuje pravděpodobnost dalšího sklouznutí, delece ji snižuje. Ke sklouznutí dochází pouze tam, kde za sebou leží více než dvě opakování mikrosatelitních motivů. Při replikaci nerepetitivních sekvencí se vlásenky netvoří (Flégr, 1995).

II. Rekombinací mezi dvěma molekulami dsDNA (dvouřetězcová) (Jeffreys *et al.*, 1994). Tato teorie vysvětluje vznik změny délky mikrosatelitních opakování dvěma způsoby:

a) nelegitimní rekombinace, která nastává, jestliže v buňce dojde k nesprávnému párování dvou vzájemně komplementárních, ale nehomologních úseků DNA a k následnému *crossing – overu* mezi těmito úseky. Nejčastěji k tomuto dochází v dlouhých repetitivních sekvencích. Účinkem tohoto typu rekombinací dochází k postupnému

odstraňování úseků DNA ležících mezi dvěma sekvenčně příbuznými úseky. Sekvenčně příbuzné úseky se tak dostávají k sobě a dávají vzniknout tandemovým repeticím. Nelegitimní rekombinace způsobuje duplikace daného úseku na jednom chromozómu a tím jeho delecii na chromozómu druhém. Ve zmnožených úsecích se pravděpodobnost dalších duplikací zvyšuje (Flégr, 1995).

b) genovou konverzí, při které se přepíše sekvence některého úseku DNA podle sekvence úseku jiného. Sekvence, která funguje jako templát, se pak může postupně šířit na mnoho míst genomu (Jeffreys *et al.*, 1994)

2.3.3 Struktura mikrosatelitů

Mikrosatelitový motiv může být tvořen různými počty opakování. Nejvíce se objevují dinukleotidová opakování (Wang *et al.*, 1996). U druhu *Drosophila melanogaster* je nejběžnější repetice $(CA/TG)_n$ (Schug, 1998). V rostlinných genomech jsou nejčastější motivy $(AT/AT)_n$ a $(GA/TC)_n$ (Stahlings, 1991). U člověka je jedním z nejčastějších opakování $(AC/GT)_n$ (Hamada *et al.*, 1984). U bakterií se mikrosatelitní sekvence vyskytují jen velmi málo a jednou z nejčastějších je mononukleotidová repetice $(A/T)_n$ (Hancock, 1996). V genomu se také mohou vyskytovat trinukleotidová a tetranukleotidová opakování, jejichž výskyt však není častý. V rostlinných genomech jsou to opakování $(AAG/CTT)_n$, $(AAT/ATT)_n$ (Wang *et al.*, 1996).

Podle složení dělíme mikrosatelity na:

- I. dokonalé – tvořené souvislým motivem
- II. nedokonalé – sled opakovaných jednotek je přerušován náhodnými bázemi
- III. složené – je – li mikrosatelit tvořen několika různými motivy (Rosypal *et al.*, 1989)

2.3.4 Funkce mikrosatelitů

Biologický význam mikrosatelitů pro funkci buňky není dosud znám. Je možné, že se podílí na regulaci rekombinace (Wals *et al.*, 1990), replikace nebo transkripce (Hamada *et al.*, 1984).

Přítomnost některých sekvencí $(CA/TG)_n$ nebo $(GA/TC)_n$, ovlivňuje strukturu DNA vytvářením neobvyklých sekundárních konformací. Tato skutečnost může mít vliv na ohebnost DNA. Takto vzniklá sekundární uspořádání se mohou stát důležitým místem vazby některých regulačních proteinů (Rosen *et al.*, 1991).

Na transkripční aktivitu promotoru nebo čtecího rámce může mít vliv variabilita v počtu tandemových repetitivních sekvencí (Sarkari *et al.*, 1994). Variabilita v počtu tandemových repetitivních sekvencí může také ovlivnit kvantitativní charakter síly exprese mRNA a tak mohou být repetitivní sekvence hlavním zdrojem variability kvantitativních znaků a schopnosti evoluční adaptace (Kashi *et al.*, 1997). Z tohoto důvodu je možné použít mikrosatelity jako markery pro určování vazeb mezi regulačními geny, nemocemi a morfologickými znaky.

2.3.5 Vlastnosti mikrosatelitů

Pro mikrosatelitní sekvence je velice typická tvorba vlásenek. Tyto mohou vznikat samovolně při renaturaci denaturovaného úseku s trinukleotidovými repetitivními sekvencemi nebo po transkripci v okamžiku, kdy dochází k obnovení dvoušroubovice. Tyto neobvyklé struktury mohou bránit odvíjení vláken dsDNA a v důsledku toho nastává zablokování replikace a transkripce. Úsek DNA s trinukleotidovými repetitivními sekvencemi je konformačně velmi variabilní.

2.3.6 Mutace mikrosatelitních lokusů

Mikrosatelity mutují asi 10 000 krát častěji než jiné oblasti genomu. Tyto mutace mají zvláštní podobu. Nejde o běžné změny (delece, inserce), ale o přibývání nebo ubývání kopií základního motivu. Tyto mutace nazýváme dynamické.

Běžné bodové mutace se vyskytují s frekvencí asi 10^{-9} . U druhu *Escherichia coli* mutují mikrosatelitní sekvence rychlostí 10^{-2} na lokus a replikaci (Lewinson a Gutman, 1987) u kvasinek $10^{-4} - 10^{-5}$ (Henderson a Peters, 1992). U člověka byla zjištěna rychlost mutací 10^{-3} (Weber a Wong, 1993). U myši je tato frekvence odhadována rozmezí $10^{-3} - 10^{-4}$ (Dallas, 1992). U druhu *Drosophila melanogaster* byl zjištěn mutační poměr 6×10^{-6} (Schug *et al.*, 1998).

2.3.7 Použití mikrosatelitů

V genomech eukaryotních organismů se mikrosatelity vyskytují velice často, jsou kompatibilní a polymorfní. Jsou používány ke konstrukci genetických map a k mapování některých dědičných chorob (Ovesná *et al.*, 2002). Mikrosatelitní sekvence jsou využívány především v populační genetice ke sledování vývoje populací (Edwards *et al.*, 1992)

Ve velkých vzájemně příbuzných rodinách se provádí genotypizace mikrosatelitních sekvencí metodou PCR. Vypovídací hodnota jednotlivých mikrosatelitů je však velmi závislá na počtu opakování a dále na tom, jsou – li dokonalé nebo nedokonalé (Refseth *et al.*, 1997).

Mikrosatelitů se také užívá k ověřování rodičovství. Výhodou mikrosatelitů je především vysoký stupeň polymorfismu v důsledku velkého počtu alel na jednotlivých lokusech (Rosypal *et al.*, 1989).

2.4 Přehled metod pro testování polymorfismu DNA

DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Jsou využívány například pro DNA fingerprinting, testování otcovství, genetické mapování, populační genetiku a populační ekologii a při studiu evoluce na molekulární úrovni. DNA markery jsou aplikovatelné u všech organismů, u nichž je zvládnutá technika izolace DNA. Odlišné úseky DNA jsou vystaveny různým selekčním tlakům. Většina sekvencí kódujících životně důležité proteiny podléhá silnému selekčnímu tlaku, a proto jsou nevariabilní a pro analýzy většinou nepoužitelné. V nekódujících oblastech intronů a mezigenových regionů, u kterých lze předpokládat selekční neutralitu a jejichž míru polymorfismu může ovlivňovat pouze genetický drift, se snadno hromadí mutace, a proto jsou nekódující sekvence variabilní.

Využití molekulárních markerovacích technik je založeno na:

1. specifickém restričním štěpení DNA a následné hybridizaci se značenou sondou – např. *RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)* – polymorfismus délky restričních fragmentů
2. amplifikaci specifických fragmentů v podmínkách *in vitro* např. *PCR (Polymerase Chain Reaction)* – polymerázová řetězová reakce, *PCR-STS (PCR – Single Tagged Site)* – amplifikace jednoho cílového místa, *RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)* – polymorfismus náhodně amplifikované DNA, mikrosatelity (*SSRs* nebo *STRs*) (*Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats*) – tandemové opakování krátkých motivů.
3. Na různých kombinacích restričního štěpení, hybridizace a amplifikace např.: *PCR/RFLP* – délkový polymorfismus restričně štěpené amplifikované DNA, *VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)* – variabilita v počtu tandemových opakování, *AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)* – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů.

2.4.1 Charakteristika nejdůležitějších metod pro detekci polymorfismu na úrovni DNA.

Elektroforéza

Elektroforéza je nejdůležitější metodou užívanou k separaci elektricky nabitých nukleových kyselin. Jedná se fyzikálně – chemickou metodu pro dělení látek v elektrickém poli (Erdelský a Frič, 1979).

I. Elektroforéza v agarózovém gelu

II. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (*PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

a) Denaturační *PAGE* – na gel se nanáší denaturovaná, jednořetězcová DNA a dělení probíhá za přítomnosti denaturantu v gelu. Molekuly se dělí jen na základě své velikosti. Využívá se hlavně pro určení velikosti fragmentů DNA, při testování mikrosatelitů a sekvenování.

b) Nedenaturační *PAGE* – vzorek se na gel nanáší nedenaturovaný. Separace je ovlivněna nejen velikostí, ale také prostorovou strukturou DNA.

Pro vizualizaci gelů se používá barvení fluorescenčními barvivy, stříbrem, autoradiografií a neradioaktivním značením (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tato metoda nachází uplatnění v mnoha oblastech molekulární genetiky. Využívá se pro specifickou amplifikaci částí DNA, v soudním lékařství pro genetický fingerprinting, v lékařství pro prenatální diagnostiku genetických chorob, určení přítomnosti cizího genomu infekčního původu, detekci jednotlivých alel polymorfních lokusů, sekvenování DNA a dalším účelům.

Metoda PCR byla poprvé popsána v roce 1985 (Saiki *et al.*, 1985). Autoři byli oceněni Nobelovou cenou v roce 1993. Metoda slouží k získávání dostatečného množství specifické DNA pro další analýzy. Principem je denaturace DNA (oddělování komplementárních vláken) a její denaturace (opětné spojování) v kombinaci se syntézou DNA katalyzovanou specifickou DNA polymerázou (od roku 1988 *Taq* polymerázou), která je termostabilní, protože pochází z termofilní bakterie *Thermophylus aquaticus*. Cyklus sestává ze tří krátkých fází, během nichž se střídají teploty. V první fázi dochází při teplotě 92 – 96 °C k denaturaci vzorku DNA. Ve druhé fázi, zvané annealing, dochází

v důsledku snížení teploty na 35 – 65°C k navázání syntetických oligonukleotidů (krátkých úseků jednovláknové DNA) komplementárních k oběma vláknům okrajových úseků DNA, která má být amplifikována. Ve třetí fázi se teplota zvyšuje na 72°C, kdy je aktivita *Taq*-polymerázy optimální, a dochází k syntéze DNA. Tento proces se opakuje cyklicky 30 až 50krát (Rosypal *et al.*, 1989). Po skončení procesu je ve vzorku přítomná v podstatě jen amplifikovaná DNA, kterou je možné detekovat pomocí elektroforézy (Ondřej a Drobník, 2002). Velmi často je nutná optimalizace složení reakční směsi pro dosažení dostatečně vysokých a spolehlivých výtěžků (Vondřejš a Stročová, 1997). Skutečná účinnost reakce se odhaduje na 60 – 85% (Saiki *et al.*, 1988).

PCR v reálném čase (*Real-Time PCR*)

Jedná se o moderní metodu sledování průběhu PCR v reálném čase na základě sledování intenzity fluorescenčního signálu.

Používá se pro kvantifikaci genomové DNA nebo mRNA, analýzu bodu tání produktu (melting analysis) při ověřování identity a kvality produktu a při genotypizaci pro přímé stanovení genotypu (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů je metoda kombinující restriční štěpení DNA (technika RFLP) a amplifikaci DNA (technika PCR) (Vos *et al.*, 1995; Graman *et al.*, 1999).

Vychází z toho, že metoda RFLP dává poměrně chudé spektrum fragmentů a tedy malou variabilitu a nízkou rozlišovací schopnost (Ondřej, 1999). Oproti metodám RFLP a RAPD má řadu výhod, mezi nejdůležitější patří opakované generování velkého množství markerů (Čurn a Sáková, 1996). Typický AFLP fingerprint obsahuje 50 – 100 amplifikovaných fragmentů, z čehož až 80% je možné využít jako markery. U velkých, hodně komplexních genomů se používají 2 různé restriktázy (hojně štěpící a vzácně štěpící) a preamplifikace (PCR) s neselektivními primery (bez selektivních bází), která slouží k prvnímu namnožení DNA před následnou selektivní PCR (Knoll a Vykoukalová, 2002). Amplifikace restričních fragmentů je založena na ligaci dvouvláknových (ds) adaptorových sekvencí na konec restričního místa, což slouží jako „univerzální“ vazebné místo pro primery PCR. Touto metodou se detekuje polymorfismus v délce fragmentu, v restričním místě nebo v místě selektivních bází (Jones *et al.*, 1997).

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – polymorfismus náhodně amplifikované DNA)

Stejně jako podobná metoda označovaná AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), je tato metoda používaná pro tvorbu genomového fingerprintu u druhů, kde není mnoho informací o sekvenci, která se bude amplifikovat. K zahájení PCR se používá krátký primer o délce 6 – 10 nukleotidů, který se váže na příslušná místa templátové DNA (Caetano-Anollés *and* Gresshoff, 1997).

V některých modifikacích se první dva cykly provádějí s jedním krátkých náhodným primerem za mírných reakčních podmínek a další cykly se specifickými primery. Vzniká řada PCR fragmentů, které jsou separovány agarózovou gelovou elektroforézou a vizualizovány pomocí ethidium bromidu a ve spektru *UV* záření. Jednotliví jedinci (populace) se odlišují přítomností jednotlivých fragmentů, podle toho, kde na DNA primer našel homologii místa, což je právě důsledek polymorfismu DNA (Čurn a Sáková, 1996).

RAPD markery jsou představovány fylogeneticky konzervovanými produkty, specifickými pro jedince, náhodně rozloženými v genomu templátové DNA (Williams *et al.*, 1990).

Pro získání reprodukovatelných výsledků jsou kritické především tyto faktory: přesná optimalizace koncentrace DNA, reprodukovatelnost cyklu, kvalita a koncentrace primerů, koncentrace Mg^{2+} , výběr polymerázy a přesnost pipetování.

RAPD metoda vykazuje vysoký stupeň polymorfismu. Z tohoto důvodu mohou být genetickými markery pro tvorbu genetických map, mapování QTL, fingerprinting, měření genetických vzdáleností mezi populacemi atp. RAPD technika má dominantní charakter, a proto nelze odlišit hetero- a homozygotní genotyp (Williams *et al.*, 1993).

RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*)

Pomocí polymorfismu délky restrikčních fragmentů se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa.

Tato metoda souvisí s objevem specifických restrikčních endonukleáz, které štěpí řetězec DNA uvnitř specifické sekvence nukleotidů (Smith a Wilcox, 1970).

Genomová DNA je štěpena příslušnou restrikční endonukleázou, separována elektroforézou na agarózovém gelu (*AG*) a přenesena (blotována) na membránu pomocí tzv. Southernova přenosu (Sambrook *et al.*, 1989). Po hybridizaci se značenou sondou a

vizualizaci lze zjistit polymorfismus ve velikosti vzniklých restrikčních fragmentů DNA. Velkou výhodou metody RFLP je její schopnost identifikovat polymorfismus i uvnitř markerů typu I tedy markerů kódujících exprimované geny, které mají nízkou hladinu polymorfismu a jsou málo využitelné pro studium diverzity rodin a populací. Pro štěpení se používají restrikční endonukleázy, jež se specificky vážou na DNA a štěpí ji ve specifických místech, nacházejících se uvnitř nebo blízko rozpoznávací sekvence. (Gebhardt *et al.*, 1989). Mutace v restrikčním místě způsobí změnu velikosti restrikčních fragmentů a tedy i velikost proužků po hybridizaci.

RFLP markery jsou kodominantní, využívají se pro DNA fingerprinting a mohou být použity i pro populační studie a klasifikaci diverzity, přičemž poskytují dostatečný polymorfismus na úrovni studovaného genomu. RFLP markery jsou použitelné také pro fylogenetické studie, za předpokladu, že hodnotíme polymorfismus obsažený v restrikčních místech. Vzhledem k relativní pracnosti metody s relativně vysokými mzdovými a materiálními náklady, dále pak k požadavku velmi kvalitní DNA a obtížnosti automatizace se dnes dává přednost její modifikaci vzniklé spojením s technikou PCR (PCR-RFLP). Metoda RFLP je využívána také v soudním lékařství nebo k určování paternity (Sambrook a Russel, 2001).

PCR-RFLP (syn. CAPS – *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) metoda je kombinací amplifikace a restrikčního štěpení, kdy po amplifikaci úseku DNA metodou PCR následuje rozštěpení PCR produktu specifickou restrikční endonukleázou. Cílová sekvence použité endonukleázy je shodná s místem, kde došlo k změně polynukleotidového řetězce. Inzercí, delecí nebo substitucí štěpné místo buď zaniká nebo vzniká nové, pro jinou endonukleázu. Výsledek se zjišťuje pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a vizualizace fragmentů je nejčastěji prováděna použitím ethidium bromidu v UV světle (Sambrook *et al.*, 1989).

Metoda SSR (*Simple Sequence Repeat* – mikrosatelity)

Mikrosatelity (syn. *STR short tandem repeats*, *SSR*) jsou krátké tandemové repetice složené z mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidových motivů. Vyskytují se ve všech eukaryotických genomech, ale jejich funkce je stále diskutabilní. Významnou vlastností je vysoký stupeň polymorfizmu způsobený variabilním počtem tandemových repetic (obvykle 10-30). Polymorfismus mikrosatelitů může být rychle a spolehlivě testován pomocí PCR a vizualizován na PAGE – elektroforézy na polyakrylamidovém gelu.

Sekvenování

Sekvenování je metoda k zjištění pořadí tj. sekvence nukleotidů v molekule DNA nebo v RNA.

Je nejpřesnějším, avšak pracovně nejnáročnějším, nejsložitějším a nejdražším způsobem studia DNA, při kterém se určuje přesné pořadí bází v určitém úseku DNA.

Pro sekvenování byly vyvinuty dvě metody:

a) Sangerova metoda (1977) – tato metoda využívá syntézy komplementárního řetězce DNA polymerázami *in vitro*, ukončované náhodně v místě jednotlivých bází (Sanger a Coulson, 1977).

b) Maxam-Gilbertova metoda (1977) – při této metodě dochází k chemickému štěpení DNA v místě určitých bází (Maxam a Gilbert, 1977).

Nejčastěji se používá Sangerova metoda. Sekvenovaný úsek DNA, např. klonovaný fragment nebo produkt PCR se rozdělí do čtyř částí, do každé z nich se přidají všechny volné deoxynukleotidy a pak odděleně do každé jen po jedné z jejich dideoxy-variant: *ddATP*, *ddTTP*, *ddCTP*, *ddGTP*, kterým chybí 3'-OH skupina. Reakci enzymaticky zajišťuje některá z DNA polymeráz.

Využití výsledků sekvenčních analýz musí být nutně spojeno s vytvářením molekulárně genomových databází, které umožňují uchovávat, organizovat a zpřístupňovat sekvenční data. Tyto databáze umožňují porovnávání nových sekvencí s již dříve zjištěnými sekvencemi jednotlivých genů jiných organismů se známou funkcí. To umožňuje získaným, zatím neznámým sekvencím přiřazovat pravděpodobné funkce a vyhledávat v genomu sekvence, které jsou pravděpodobně homologní genům, které byly poznány jinde. V současné době byly sekvenovány genomy četných mikroorganismů. Z eukaryotních genomů bylo do konce roku 2005 sekvenování dokončeno u genomu kvasinky, hlístice, octomilky a v neposlední řadě i u genomu člověka (Ondřej a Drobník, 2002).

3. Charakteristika odrůd

Pro analýzu byl vybrán soubor dvaceti odrůd konzumních brambor. Kriteřiem výběru bylo zastoupení odrůd na množitel'ských plochách v ČR v roce 2005 (Přehled odrůd 2005, brambory).

3.1 Odrůdy velmi rané

ADORA

Odrůda pro letní konzum, zařazena do varného typu B-BC. Vařené hlízy jsou středně vlhké, kypré až středně pevné konzistence. Hlízy jsou velké, oválné, s krémovou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz velmi rychlý. Počet hlíz pod trsem nízký.

K napadení rakovinou bramboru biotypu 1 středně náchylná, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: vysoké výnosy v raných termínech při předčasných sklizních v ranobramborářské oblasti

Pěstitel'ská rizika: náchylnost k napadení plísní bramboru na nati, menší odolnost proti napadení virovými chorobami (Y virus) a proti mechanickému poškození hlíz

COLETTE

Odrůda pro letní a podzimní konzum, zařazena do varného typu BA. Vařené hlízy jsou středně pevné, středně vlhké, jemné struktury, po uvaření slabě až středně tmavne. Hlízy jsou středně velké, oválné, vzhledné, s mělkými očky, se světle žlutou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz je pomalý. Počet hlíz pod trsem střední až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: velmi dobrá kvalita konzumu, odolnost proti napadení virovými chorobami a proti napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru

Pěstitel'ská rizika: střední až nižší výnos, náchylnost k napadení vločkovitostí hlíz bramboru

IMPALA

Odrůda pro letní a podzimní konzum, zařazena do varného typu B. Vařené hlízy jsou kypré až středně pevné, středně až silně vlhké, bez barevných změn. Hlízy jsou velké, oválné až dlouze oválné, velmi vzhledné, velikostně a tvarově vyrovnané, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě rychlý, nárůst hlíz velmi rychlý. Počet hlíz pod trsem nízký. Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: velmi vysoké výnosy v raných termínech při předčasných sklizních v ranobramborářské oblasti, vysoké výnosy při konečné sklizni

Pěstitelská rizika: menší odolnosti proti napadení virovými chorobami a proti napadení plísní bramboru na nati, nízký obsah sušiny v hlízách

MAGDA

Odrůda pro letní a podzimní konzum, zařazena do varného typu B, lze využít i pro úpravu smažením na hranolky. Vařené hlízy jsou velmi chutné, pevné konzistence. Hlízy jsou středně velké až malé, krátce oválné, se středně hlubokými očky, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz velmi rychlý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 rezistentní, k napadení háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 náchylná.

Přednosti: velmi vysoké výnosy v nejranějších termínech sklizní, dobrá konzumní kvalita, odolnost proti napadení virovými chorobami, odolnost hlíz proti mechanickému poškození

Pěstitelská rizika: náchylnost k napadení plísní bramboru na nati

ROSARA

Odrůda pro letní a podzimní konzum, zařazena do varného typu BA. Vařené hlízy jsou středně pevné až pevné konzistence, slabě moučnaté. Hlízy jsou středně velké, oválné, vzhledné, s tmavě žlutou dužninou a červenou slupkou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní

Přednosti: konzumní kvalita, odolnost proti napadení virovými chorobami a aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru

Pěstitelská rizika: nízké výnosy v raných termínech předčasných sklizní, tvorba kapkovitých hlíz

VELOX

Odrůda pro letní a podzimní konzum, zařazena do varného typu B, lze využít i pro úpravu smažením na hranolky. Vařené hlízy jsou středně pevné, středně vlhké. Hlízy jsou středně velké, oválné, vzhledné, s mělkými očky, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě rychlý a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: vysoké výnosy v nejranějších termínech sklizní, odolnost proti napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru

Pěstitelská rizika: náchylnost k napadení plísní bramboru na natí, menší odolnost proti napadení plísní bramboru na hlízách, horší skladovatelnost (silné klíčení ve skládce)

3.2 Odrůdy rané

ADÉLA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu B. Vařené hlízy jsou slabě až středně moučnaté, středně vlhké, chutné, netmavnou. Hlízy jsou středně velké, krátce oválné, s mělkými očky, s tmavě žlutou dužninou. Počáteční růst natě středně rychlý, nárůst hlíz pomalý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

K napadení rakovinou bramboru biotypu 1 náchylná, proti napadení háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: vysoký výnos, odolnost proti napadení virovými chorobami a aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru, velmi dobrá konzumní kvalita

Pěstitelská rizika: náchylnost k napadení vložkovitostí hlíz bramboru

DALI

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu BA. Vařené hlízy jsou středně pevné, jemné struktury, chutné, bez barevných změn. Hlízy jsou velké, oválné, vzhledné, vyrovnané velikostí a tvarem, se žlutou dužninou a žlutou hladkou slupkou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: odolnost proti napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru, konzumní kvalita

Pěstitelská rizika: ročníkové kolísání sušiny

KARIN

Konzumní odrůda zařazena do varného typu BA. Vařené hlízy jsou slabě až středně moučnaté, středně pevné konzistence. Hlízy jsou středně velké, dlouze oválné, vzhledné, vyrovnané tvarem, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz pomalý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 rezistentní, k napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 náchylná.

Přednosti: odolnost proti virovým chorobám a proti napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru, kvalita konzumu.

Pěstitelská rizika: středně vysoký až nízký výnos, tvorba kapkovitých hlíz při nevyrovnaných srážkách

MARABEL

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu BA-B, vhodná pro úpravu loupáním. Vařené hlízy jsou středně pevné, s jemnou strukturou, středně vlhké, velmi chutné, bez barevných změn. Hlízy jsou středně velké, oválné, velmi vzhledné, s tmavě žlutou dužninou a žlutou hladkou slupkou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 náchylná, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: vysoký výnos, velmi dobrá konzumní kvalita, vzhledné hlízy, odolnost proti napadení virovými chorobami, odolnost proti napadení virovými chorobami, odolnost proti šednutí dužniny

Pěstitelská rizika: ročníkové kolísání obsahu sušiny

SANTANA

Odrůda pro zpracování na hranolky a pro přímý konzum, varného typu C. Vařené hlízy jsou kypré, slabě až středně vlhké, silně moučnaté, středně hrubé až hrubé struktury. Hlízy jsou středně velké, dlouhé, vzhledné, a s mělkými očky, se světle žlutou dužninou.

Počáteční růst natě a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

K napadení rakovinou bramboru biotypu 1 silně náchylná, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: středně vysoký až vysoký výnos, vysoká výtěžnost hlíz pro zpracování na hranolky .

Pěstitelská rizika: menší odolnost proti mechanickému poškození, náchylnost k šednutí dužniny

SECURA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu B. Vařené hlízy jsou středně moučnaté, středně pevné konzistence, bez barevných změn. Hlízy jsou středně velké, oválné, vzhledné, vyrovnané tvarem, s tmavě žlutou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: nemá sklon k přerůstání hlíz, kvalita konzumu

Pěstitelská rizika: menší odolnost proti napadení plísní bramboru na nati

3.3 Odrůdy polorané

AGRIA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu B, vhodná pro zpracování na hranolky. Vařené hlízy jsou kypré, středně až silně moučnaté, po uvaření netmavnou. Hlízy jsou velké, oválné, s tmavě žlutou dužninou. Počáteční růst natě rychlý, nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 náchylná, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: velmi vysoký výnos, velké hlízy, vhodnost pro zpracování na hranolky

Pěstitelská rizika: náchylnost k napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru, menší odolnost hlíz proti mechanickému poškození, horší skladovatelnost

DITTA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu AB. Vařené hlízy jsou salátové, středně pevné až pevné konzistence, slabě moučnaté. Hlízy jsou středně velké, dlouze oválné, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: velmi dobrá kvalita konzumu salátového typu, odolnost proti napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru, odolnost hlíz proti mechanickému poškození.

Pěstitelská rizika: středně vysoký až nízký výnos, menší odolnost proti napadení virovými chorobami, náchylnost k napadení vložkovitostí hlíz bramboru

FILEA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu BA. Vařené hlízy jsou pevné, středně vlhké, mají jemnou až středně hrubou strukturu, chutné, slabě až středně tmavou. Hlízy jsou středně velké až malé, dlouze oválné, s velmi mělkými očky, s tmavě žlutou dužninou. Počáteční růst natě středně rychlý a nárůst hlíz pomalý. Počet hlíz pod trsem střední.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 silně náchylná, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: velmi dobrá kvalita konzumu salátového typu, odolnost proti napadení virovými chorobami a proti napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru

Pěstitelská rizika: nízký výnos, citlivost na sucho

LAURA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu B-BC, lze využít i pro úpravu smažením na hranolky. Vařené hlízy jsou středně moučnaté, středně hrubé struktury, středně vlhké, barevně stabilní. Hlízy jsou středně velké, dlouze oválné, s velmi mělkými očky, s tmavě žlutou dužninou, červenou slupkou. Počáteční růst natě středně rychlý, nárůst hlíz pomalý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

K napadení rakovinou bramboru biotypu 1 slabě náchylná s polní rezistencí, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: odolnost proti napadení virovými chorobami, velmi vzhledné, velikostně vyrovnané hlízy.

SOLARA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu B. Vařené hlízy jsou slabě až středně moučnaté, s jemnou až středně hrubou strukturou, velmi chutné, netmavnou, v průběhu skladování je kvalita stabilní. Hlízy jsou středně velké, oválné, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě a nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem střední.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 slabě náchylná s polní rezistencí, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: kvalita konzumu, odolnost proti šednutí dužniny

Pěstitelská rizika: nízký výnos

3.4 Odrůdy polopozdní až pozdní

ASTERIX

Polopozdní konzumní odrůda pro přímý konzum, zařazena do varného typu BC, vhodná pro zpracování na hranolky a suché výrobky. Vařené hlízy jsou středně až silně moučnaté, kypré konzistence, středně hrubé až hrubé struktury. Hlízy jsou velké, oválné, vyrovnané tvarem a velikostí, se žlutou dužninou a červenou slupkou. Počáteční růst natě rychlý, nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem střední.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 a hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: vysoký výnos

Pěstitelská rizika: silná náchylnost k napadení virovými chorobami (Y virus), menší odolnost proti napadení plísní bramboru na nati

MARENA

Pozdní konzumní odrůda, zařazena do varného typu B, lze využít i pro úpravu smažením na hranolky. Vařené hlízy jsou středně pevné, středně moučnaté, středně vlhké, chutné, slabě až středně tmavnou. Hlízy jsou velké, krátce oválné, vzhledné s mělkými očky, žlutou dužninou a hladkou žlutou slupkou. Počáteční růst natě středně rychlý, nárůst hlíz pomalý. Počet hlíz pod trsem středně vysoký až nízký.

K napadení rakovinou bramboru biotypu 1 silně náchylná, proti napadení hád'átkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: středně dobrá konzumní kvalita, odolnost proti šednutí dužniny

Pěstitelská rizika: náchylnost k napadení vločkovitostí hlíz bramboru

SAMANTANA

Konzumní odrůda, zařazena do varného typu B. Vařené hlízy jsou středně moučnaté, středně vlhké, chutné, slabě až středně tmavnou. Hlízy jsou středně velké až malé, kulovité, se středně hlubokými až mělkými očky, se žlutou dužninou. Počáteční růst natě rychlý, nárůst hlíz středně rychlý. Počet hlíz pod trsem vysoký.

Proti napadení rakovinou bramboru biotypu 1 silně náchylná, proti napadení háďátkem bramborovým biotypu Ro 1 rezistentní.

Přednosti: velmi vysoký výnos, dobrá kvalita konzumu, odolnost proti napadení virovými chorobami a proti napadení aktinomycetovou obecnou strupovitostí bramboru, odolnost mechanickému poškození hlíz

Pěstitelská rizika: náchylnost k napadení vločkovitostí hlíz bramboru

Přehled analyzovaných odrůd brambor

Číslo vzorku	Odrůda	Číslo vzorku	Odrůda
1	Adora	58	Santana
6	Colette	59	Secura
9	Impala	69	Agria
16	Magda	72	Ditta
20	Rosara	73	Filea
24	Velox	81	Laura
27	Adéla	91	Solara
37	Dali	98	Asterix
43	Karin	106	Marena
52	Marabel	117	Samantana

4. Materiál a metody

4.1 Izolace hlízové šťávy

Pro analýzy byly použity hlízy vybraných registrovaných odrůd brambor, které byly získány z pracoviště ÚKZÚZ..

Izolace DNA byla prováděna ze získané hlízové šťávy. Hlízy byly zmrazeny na -20° po dobu minimálně 16 hodin, následně byly rozmrazeny při pokojové teplotě. Rozmrzlé hlízy byly nejprve opláchnuty pod tekoucí vodou, následně byly rozříznuty a hlízová šťáva byla vymačkána do menší kádinky (nůž a kádinky se musí vždy pod tekoucí vodou opláchnout kvůli zabránění kontaminaci). Do Fisher-zkumavky (15 ml) bylo přeneseno 4,5 ml šťávy a byl přidán konzervant (110 μ l, Konzervační roztok: siřičitan sodný Na_2SO_3 - 5,00 g, disiřičitan sodný $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ - 3,75 g, deionizovaná voda - do 100 ml lze skladovat při 6°C). Směs byla centrifugována 5 minut, při 6 000 ot/min, při 4. Supernatant byl přenesen do 1,5 ml mikro-zkumavek. Pro účely extrakce DNA bylo odpipetováno 300 μ l supernatantu, takto získaný materiál byl uchováván při -20°C .

4.2 Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)

Hlízová šťáva se přenesse do 1,5 ml reaction tube a přidá se 400 μ l Lysis Buffer P a 20 μ l proteinázy K. Vortexovat a nechat 30 min inkubovat při 65°C . Během inkubace 2 – 3 krát promíchat. Připravit si Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube.

Vzorky přenést na Spin Filter. Centrifugovat 10 min při 12000 rpm. Přidat 200 μ l Binding Buffer P a vortexovat.

Umístit nové Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube, přenést vzorky a 1 min. inkubovat. Centrifugovat 1 min. při 12000 rpm.

Odstranit filtrát a Spin Filter umístit zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Přidat 550 μ l Wash Buffer I a centrifugovat 1 min. při 12000 rpm. Odstranit filtrát a Spin Filter umístit zpět do 2,0 ml Receiver Tube.

Přidat 550 μ l Wash Buffer II a centrifugovat 1 min. při 12000 rpm. Odstranit filtrát a Spin Filter umístit zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Krok opakovat.

Nakonec centrifugovat 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.

Spin filter umístit do nových 1,5 ml Receiver Tube a přidat 50 – 100 μ l předeřátého na 65°C Elution Buffer D. Inkubovat 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugovat 1 min. při 10000 rpm.

Pokud chceme vytvořit 1. a 2. eluát přidat 50 μ l předeřátého elučního pufru. Inkubovat 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugovat 1 min. Postup opakovat znovu s dalšími 50 μ l Elution buffer D, ale do nové 1,5 ml Receiver Tube. Vznikne nám tak 50 μ l 1. a 2. eluátu.

4.3 Složení reakční směsi PCR

Tab.1:Složení reakční směsi bylo optimalizováno pro celkový objem reakce 25 μ l.

PPP Master mix (TopBio)	12,5 μ l
Primer F	0,5 μ l
Primer R	0,5 μ l
DNA	1 μ l
H ₂ O	10,5 μ l

Tab. 2:Průběh reakce

Počáteční denaturace	94°C	3 min
Denaturace	94°C	30 s
Annealing	Dle použitého primeru*	30 s
Elongace	72°C	30 s
Závěrečná elongace	72°C	5 min

* jednotlivé teploty annealingu viz tab.3

Reakce probíhala ve 35 cyklech

Tab.3: Teploty annealingu

primerový pár	Teplota
STM2005	54°C
STM1102	55°C
STM3012	57°C
STWIN	54°C
STGBSS	54°C
STS	54°C

PCR produkt byl separován na 3% agarózovém gelu a vizualizován pomocí ethidiumbromidu. Pro lepší rozlišitelnost amplifikovaných produktů byla posléze používána 15% PAGE.

4.4 Digitální obrazová analýza gelů a hodnocení dat

Pro vyhodnocování dat byl využit speciální software – *BioProfil 1D++* (Vilber Lourmat, France). Je to softwarový produkt určený zejména pro analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter. Umožňuje konstrukci rozsáhlých databází "fingerprintů", které pak mohou být porovnávány.

Korekce obrázků gelů byly prováděny za použití grafického software *Adobe Photoshop 7.0 CE*.

4.5 Clusterová analýza

Celkem přehledným a ilustrativním výsledkem analýzy spekter je možnost seskupení podobných spekter na základě výpočtu *podobnostní matice* - koeficientů podobnosti každého vzorku se všemi ostatními z vybrané databáze. Výsledky matice pak byly podrobeny clusterové analýze (*UPGMA - Unweighted Pair Group Method Using Averages*) a výsledky zobrazeny jako *dendrogram*.

4.6 Statistické zpracování dat

Pro účely komplexního hodnocení SSR spekter bylo využito statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představovala prostředek pro primární zpracování elektroforeogramů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě takto zjištěných a korelovaných pruhů na gelu bylo možné sestavit matice přítomnosti nebo nepřítomnosti pruhu v dané zóně a následně provést výpočty genetických vzdáleností či podobností a sestavení dendrogramů. Pro tyto účely byl využíván program *MVSP* (Kovach Comp.Serv.).

5. Výsledky

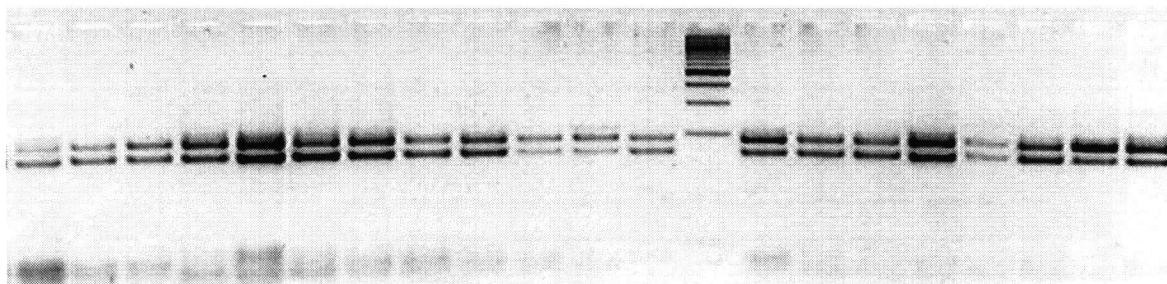
Při použití jednotlivých primerů vykazoval sledovaný soubor odrůd různou úroveň polymorfismu. Frekvence zastoupení jednotlivých fenotypů je uvedena v tabulce 4.

Tab. 4.: Frekvence zastoupení jednotlivých fenotypů mikrosatelitových markerů

Primer	Procentické zastoupení jednotlivých fenotypů		
STM 2005	15	85	-
STM 1102	85	15	-
STM 3012	0	100	-
STWIN	55	25	20
STG BBS	35	65	-

Pro znázornění rozdílů mezi použitými primery byly vybrány dvě ukázková elektroforetická spektra na 3% agarózovém gelu. Obrázek 1. představuje primer STM3012, při jehož použití sledované odrůdy není možné rozlišit. Podle obrázku 2. můžeme pomocí primeru STM1102 odlišit některé z odrůd.

Obrázek 1. Vizualizace gelu, primer STM3012



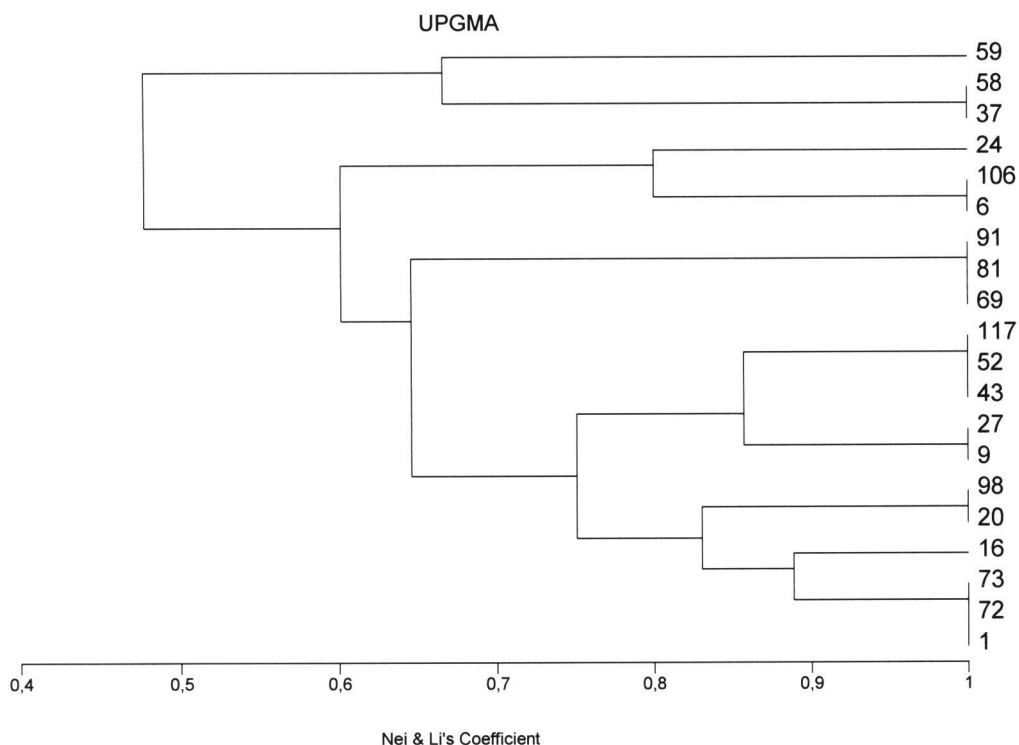
Obrázek 2. Vizualizace gelu, primer STM1102



Po proběhnutí SSR reakce s vybranými náhodnými primery byla primární data přítomnosti nebo nepřítomnosti pruhů na gelu (Tab.5) použita pro grafické znázornění

Na základě matice podobnosti byla provedena shluková analýza (Obr.3) a analýza PCA (Obr.4).

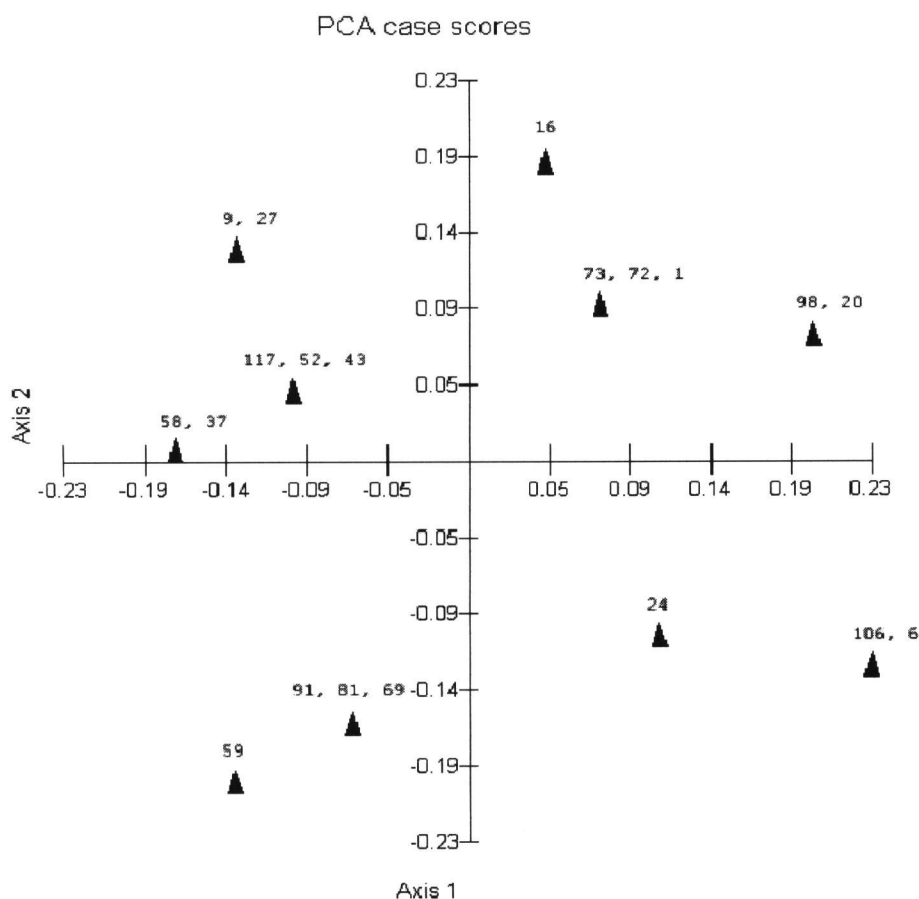
Obr.3. Dendrogram získaný metodou shlukové analýzy UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method using arithmetic Averages*)



Na celkovém dendrogramu je zaznamenáno několik skupin odrůd. Prvním typem skupin jsou vzorky, které vykazují v daných markerech 100% podobnost, jedná se o skupiny odrůd (1 - Adora, 72 - Ditta, 73 - Filea), (20 - Rosara, 98 - Asterix), (9 - Impala, 27 - Adéla), (43 - Karin, 52 - Marabel, 117 - Samantana), (69 - Agria, 81 - Laura, 91 - Solara), (6 - Colette, 106 - Marena) a (37 - Dali, 58 - Santana). Tři odrůdy 16 - Magda, 24 - Velox a 59 - Secura vytvořily samostatné skupiny tvořené pouze jednou odrůdou. Vzorek 16 má téměř 90% podobnost se skupinou vzorků (1, 72, 73) a vzorek 24 má přibližně 80% podobnost se skupinou vzorků (6, 106). Mezi skupinami vzorků (1,72,73+16) a (20,98) se zjištěná podobnost pohybuje okolo 83%, podobnost skupin (9,27) a (43, 52, 117) je podobnost vyšší než 85%. Podobnost skupin (1,72,73+16-20,98-9,27-43, 52, 117) je 75%. Podobnost skupiny vzorků (58, 37) a vzorku 59 je menší než 70%. Nejnižší hodnoty podobnosti a to pod 50% vykazuje skupina (58, 37 + 59) od všech ostatních vzorků.

Na základě clusterové analýzy byl celý analyzovaný soubor 20 odrůd rozdělen do 10 skupin. Mezi těmito skupinami je odlišnost na úrovni 10-50%. V rámci těchto skupin jsou pouze tři, které jsou tvořeny pouze jedním genotypem (16 - Magda, 24 - Velox a 59 - Secura). Pouze tyto tři odrůdy lze spolehlivě odlišit a identifikovat. Ostatní skupiny tvoří shluky po 2-3 genotypech a v rámci těchto skupin nelze jednotlivé genotypy jednoznačně identifikovat. Spolehlivé odlišení všech sledovaných odrůd by bylo možné s využitím dalších markerů, ať již molekulárních nebo morfologických či biochemických.

Obr.4. Dendrogram získaný pomocí shlukového algoritmu PCA (*Principal Components Analysis*)



Na základě ordinační analýzy jsem získal obdobné výsledky jako s použitím clustrové analýzy. Bylo vytvořeno 10 skupin, po 1-3 genotypech a tyto výsledky odpovídají clustrové analýze. Distribuce jednotlivých skupin v prostoru rovněž nevykazuje žádný trend (skupiny vzorků jsou rovnoměrně rozptýleny po celém diagramu).

6. Diskuse

Ve své práci jsem se zabýval různými možnostmi hodnocení polymorfismů odrůd konzumních brambor. Zvolený typ molekulárních markerů jsem vybral na základě projektů řešených v laboratořích Biotechnologického centra Zemědělské fakulty JU (RAPD, SSR, BBM).

Isenegger *et al.* (2001) identifikoval na základě metody RAPD 64 odrůd brambor pěstovaných v Austrálii. Úroveň polymorfismu se pohybovala od 12% do více než 20% při použití 26 RAPD primerů. Demeke *et al.* (1993) rozlišil 36 odrůd s využitím 2 RAPD primerů a Sosinki a Douches (1996) rozlišili 10 primery 46 odrůd brambor.

RAPD markery jsou s úspěchem používány pro účely hodnocení odrůdové čistoty a pravosti, pro hodnocení genových zdrojů brambor jak na úrovni kulturních odrůd tak planých genotypů. V předchozích studiích, které byly prováděny na Biotechnologickém centru (Nováková 2006 – nepublikovaná data) se vhodnost RAPD markerů neprokázala, naopak do popředí vystupují některé negativní rysy této metody, jako je nízká opakovatelnost a reprodukovatelnost Jones *et al.*, (1997). Cobb (1997) udává, že tyto nevýhody lze eliminovat vhodnou a přesnou optimalizací průběhu PCR reakce. Na tyto vlastnosti RAPD markerů poukazují například i Mueller a Wolfenbarger (1999) a Prevost a Wilkinson (1999), kteří jako další vhodné markerovací systémy používají ISSR a AFLP. Bežo *et al.* (2006) identifikovali metodou ISSR 9 genotypů lnu setého. Metodu ISSR použil Albani a Wilkinson (1998) pro detekci somaklonální variability u tkáňových kultur brambor. Ghislain *et al.* (2003) a Milbourne *et al.* (1997) doporučují použití metody SSR. Schneider a Douches (1997) jednoznačně odlišili 24 ze 40 odrůd brambor pomocí 6 SSR primerů. Feingold *et al.* (2005) používal pro tvorbu genetických map a identifikaci odrůd techniku EST - SSR. Bežo *et al.* (2006) doporučuje použití metody IRAP RBIP a REMAP.

Variabilita uložení kopií retrotranspozomů vytváří v genomu polymorfismus, čímž je možno získat informace mezi jedinci v rámci druhu i mezi druhy. Při hodnocení polymorfismu DNA pomocí retrotranspozomů se využívá početného zastoupení variabilních kopií, pozice na různých místech chromozomu, bohaté zastoupení v euchromatinu, které umožňuje získání markerů vázaných na agronomicky zajímavé vlastnosti (Kumar a Bennetzen, 1999), přesně definované pořadí nukleotidů vhodné k navrhnutí specifických primerů rozšiřováním již existujícího polymorfismu začleněním kopií retrotranspozomů v genomu (Kalendar *et al.*, 1999). Molekulárně genetické techniky, které využívají retrotranspozomy vycházejí z kombinací polohy retrotranspozomů v DNA,

primerů, které určují směr a rozsah syntézy úseků DNA polymerázovou řetězovou reakcí. Pomocí techniky PCR se amplifikují úseky mezi jednotlivými retrotranspozómy (IRAP), nebo jsou amplifikovány úseky uvnitř retrotranspozómu (RBIP), a nebo úseky mezi retrotranspozómem a mikrosatelitem (REMAP). Kumar *et al.* (1997) testoval vhodnost použití retrotranspozómů jako molekulárních markerů na jednoděložných i dvouděložných plodinách (*Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Vicia faba*, *Vicia melanops*, *Vicia sativa*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *Allium cepa*). Metody REMAP a IRAP se dále používají například pro studium mezidruhové variability rodu *Hordeum* a pro odlišení jednotlivých odrůd ječmene (Kalendar *et al.* 1999). Bežo *et al.* (2006) odlišili pomocí jediného IRAP primeru 9 odrůd, RBIP primerem odlišili 5 odrůd brambor.

Po zhodnocení metodik a na základě porovnání vhodnosti a vypovídací schopnosti jednotlivých markerů jsem přistoupil k použití analýzy SSR vybraného souboru dvaceti odrůd konzumních brambor. Pro analýzy jsem vybral 5 SSR markerů. Po amplifikaci jsem zaznamenal 10 alel. V rozsáhlejší studii poskytoval primer STM 1102 čtyři alely u odrůdy Keřkovské rohlíčky (Nováková 2006 – nepublikovaná data).

Frekvence výskytu jednotlivých fenotypů je uvedena v Tab. 4. Polymorfismus zjištěný u analyzovaných vzorků odrůd byl nižší než uvádí například Milbourne *et al.* (1997) a Ghislain *et al.* (2003). Tito autoři ve svých studiích ale používali rozsáhlých souborů genotypů a analyzovali velké množství mikrosatelitových lokusů. Ghislain *et al.* (2003) použil až 156 mikrosatelitových lokusů. Navíc do své studie zahrnul nejen kulturní odrůdy, ale i plané druhy a jejich křížence.

Při komplexním vyhodnocení 5-ti lokusů jsem zjistil poměrně vysokou míru polymorfismu, což dokumentují i statistická zpracování získaných dat. I další autoři, např. Feingold *et al.* (2005), Ghislain *et al.* (2001), Bežo *et al.* (2006) při hodnocení a interpretaci molekulárních analýz používali více markerů a markerovacích systémů.

Cooke (1999) doporučuje pro spolehlivé odlišení všech sledovaných odrůd využití dalších markerů, ať již molekulárních nebo morfologických či biochemických.

7. Závěr

Během řešení diplomové práce byly splněny hlavní cíle práce a výsledkem práce jsou následující výstupy a závěry.

- Při řešení byl optimalizován teplotní průběh PCR reakce pro jednotlivé primery.
- Byla získána spektra pěti mikrosatelitových markerů pro dvacet konzumních odrůd brambor.
- Byl zhodnocen získaný polymorfismus a odrůdy byly rozděleny do kategorií podle elektroforetického fenotypu.
- Metoda analýzy polymorfismu mikrosatelitů je vhodnou metodou pro hodnocení variability a identifikaci vybraných odrůd, avšak s určitým omezením, kterým je malý polymorfismus detekovaný v jednotlivých lokusech a pro hodnocení je vhodné použít více mikrosatelitních lokusů.

Z dosavadních výsledků a nových poznatků se jako další vhodný přístup jeví použití molekulárních technik ISSR, REMAP, IRAM, RBIP. Tyto markery vykazují vyšší míru polymorfismu a podle nejnovějších výsledků můžeme u těchto technik předpokládat použití pouze jednoho nebo několika málo primerů pro jednoznačné odlišení celého spektra odrůd.

8. Seznam literatury

- Albani, M.C., Wilkinson, M. J. (1998): Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding*. 117: 573-575.
- Armor, J.A.L., Neumann, R., Gobert, S., Jeffreys, A.J. (1994): Isolation of human simple repeat loci by hybridisation selection. *Human Molecular Genetics*. 3: 599 – 605.
- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hiller, J., Veilleux, E.(2001): Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analysis. *Genome* 44:50-62.
- Bachmann, K. (1992): Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. - *Acta Bot. Neerl.* 39: 369 - 384.
- Bežo, M., Hrubíková, K., Štefanová, V. Žiarovská, J. Bežo, M. ml., Candráková, A. (2006): Plant Germplasm evaluation retrotransposons and microsatellites. *Biotechnology 2006*. Scientific Pedagogical Publishing. ČB.
- Caetano-Anollés G., Gresshof P.M (1997): DNA markers protocols, applications and overviews, New York
- Ciampolini, R., Moazamigoudarzi, K., Vaiman, D., Dillmann, C., Mazanti, E., Foulley, J.I., Leveziel, H., Cianci, D. (1995): Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between beef cattle breeds. *Journal of Animal Science*. 73: 3259-3268.
- Cobb, B. (1997): Optimization of RAPD fingerprinting. *Springer Lab Manual* 93-102.
- Čurn V., Sáková L., (1996): Využití biochemických markerů při hodnocení biodiverzity planých druhů rostlin a řešení taxonomických otázek (Utilization of biochemical markers in biodiversity and taxonomy studies in wild flowers), *Sborník Jihočeské university Zemědělské fakulty v Českých Budějovicích, Ř. Fytotechnická* 13: 23-35.
- Čurn V. (1998): Analýza biochemických a molekulárních markerů u kulturních a planých rostlin, *Habilitační práce, JU ZF v Českých Budějovicích*.
- Dallas, J.F. (1992): Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strain of mouse. *Mammalian Genome*. 3: 452 – 456.
- Demeke, T., Kawchuk, L.M., Lynch D.R. (1993): Identification of potato cultivars and clonal variants by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Am Pot J* 70: 561-569.

- Demeke, T., Lynch D.R. Kawchuk, L.M., Kozub, G.C., Armstrong, J.D. (1996): Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Cell Report* 15: 662-667.
- Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, I., Caskey, C.T. (1992): Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomic*. 12: 241 – 253.
- Erdelský, K., Frič, F. (1979): praktikum analytické metody vo fyziológii rastlín. SPN Bratislava.
- Feingold, S., Lloyd, J., Norero, N., Bonierbale, M., Lorenzen, J.(2005): Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet* 111: 456-466.
- Flégr, J. (1995): Mechanismy mikroevoluce I. *Skriptum UK*, Praha.
- Gebhardt, C., Blomendahl, C., Schachtchabel, U., Debener, T., Salamini, F., Ritter, E. (1989): Identification of 2n breeding lines and 4nvarietis of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) with RFLP FINGERPRINTING. *Theor Appl Genet* 78: 16-22.
- Ghislain, M., Spooner, D.M., Rodríguez, F., Villamón, F., Nunez, J., Vásquez, C., Waugh, R., Bonierbale, M. (2003): Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet* 108: 881-890.
- Gordon, A.J.A. (1997): Microsatellite birth register. *Journal of Molecular Evolution*. 45: 337 – 338.
- Graman J., Čurn V. (1999): *Semenářství (Dodatek)*
- Hamada, H., Siedman, M., Howard, B.H., Gorman, C.M. (1984): Enhanced gene expression by the poly(dT-dG), poly(dC-dA) sequence. *Molecular and Cellular Biology*. 4: 2622 – 2623.
- Hancock, J.M. (1996): Microsatellite and other simple sequence in the evolution of the human genom. *Human Genom Evolution* 45: 191 – 210.
- Henderson, S.T., Peters, T.D. (1992): Instability of simple sequence DNA in *Sacharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell biology*. 12: 2749 – 2757.
- Hosaka, K., Mori, M., Ogawa, K. (1994): Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. *Am Pot J* 71: 535-546.
- Chloupek O., (1995): *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*, Academia

- Isenegger, D.A., Taylor, P.W.J, Ford, R., Franz, P., McGregor, G.R., Hutchinson, J.F. (2001): DNA fingerprinting and genetic relationship of potato kultivar (*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 911-918.
- Jeffreys, A.J., Tamaki, K., MacLeod, A., Monckton, D.G., Neil, D.L., Armour, J.A.J. (1994): Complex gene conversion events in germline mutation at human microsatellite. *Nature Genetics.* 6: 136 – 145.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, C., van de Wiel, Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linaacero, R., Vazque, A., Karp, A. (1997): Reproducibility trstiny of RAPD, AFLP and SSRmarkers in plant by a network of European laboroziem. *Molecular Breeding* 3: 381-390.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A. Schulman, a. (1999): IRAP and REMAP: two nwe retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98: 704-711.
- Kang, S., Jaworski, A., Ohshima, K., Wells, R.D. (1995): Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E.coli*. *Nature Genetics.* 10: 213 – 218.
- Kashi, Y., King, D., Soller, M.(1997): Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics.* 13: 74 – 78.
- Kim, H.S., Ward, R.W. (1997): Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter whwat (*Tritium aestivum* L. em. Theko.) based on RFLPs and coefficient of paternage. *Theor Appl Genet* 94: 472-479.
- Knoll, A. a Vykoukalová Z. (2002): Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů), 1.vydání, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s168.
- Koblížková, A. (1998): Mapování genomů rostlin pomocí mikrosatelitových markerů. *Biologické Listy.* 63: 139 – 153.
- Kumar, A., Bennetzen, J.L. (1999): Plant retrotransposon. *Annu. Rev. Genet.* 33: 479-532.
- Kumar, A., Pearce, S.R., McLean, K., Harrison, G., Helop-Harrison, J.S., Waugh, R., Flavell, A.J. (1997): The Ty1-*copia* group of retrotransposon in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100: 205-217.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987): High frequencies of short frameshifl in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research.* 15: 5323 – 5338.

- Maxam A. M., Gilbert W. (1977): A new method for sequencing DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 560 - 4.
- McGregor, C.E., Lambert, C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H., Warnich, L. (2000): A komparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica 113: 135-144.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Barid, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., Waugh, R. (1997): Comparison of PCR-based marker systém for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. Mol Breče 3: 127-136.
- Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. Tree. 14.
- Ondřej M., Drobník J. (2002): Transgenozé rostlin. Academia.
- Ovesná J., Rulcová J., Machová Poláková K., Kučera L., Leišová L. (2002): DNA markéry - současnost a perspektivy , In: Sborník přednášek z česko-slovenského workshopu "Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchovávání genových zdrojů rostlin", AGRITEC, s.r.o., 4.-6. listopadu 2002, Šumperk, pp. 85-93.
- Paz, M.M., Villeux, R.E. (1997): Genetic diversity based on radomily amplified polymorphic DNA (RAPD) and its relationship with the performance of diploid potato hybrids. Journal of the Američan Society for Horticultural Science. 122: 740-747.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J. (1999): A new systém of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato kultivar. Theor. Appl. Genet. 98: 107-112.
- Příbyl, J., Dvořák, J., Havlíček, Z.(1995): Využití markerů při selekci hospodářských zvířat. Živočišná výroba. 40: 375 – 382.
- Refseth, U.H., Fangan, B.M., Jakobsen, K.S. (1997): Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. Electrophoresis. 18: 1519 – 1523.
- Rosen, M., Yee, D., Lippman, M.E., Paik, M., Cullen, K.J.(1991): Insulin-like growth-factors in human breast-cancer breast. Cancer research and treatment. 18: 55 – 62.
- Rosypal, S., Rosypalová, A., Vondrejs, V.(1989): Molekulární genetika. 2.vydání. Státní pedagogické nakladatelství, n.p. Praha.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Falkoona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erich, H.A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science, 230, 1350-1354.
- Sambrook J., Russel D. W. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual – CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York

- Sambrook, J., Fritéz, E.F., Maniatis, T.(1989): Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA.
- Sanger F., Coulson A. R. (1977): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol. 94: 441-8, 1975.
- Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E.R., Achtman, M.(1994): Variable expression of the OPC outer-membrane protein in neisseria-meningitidis is caused by size variation of a promoter containing poly cytidine. Molecular Microbiology. 13: 207-217.
- Schneider, K., Douches, D.S. (1997): Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. Am Potato J 74: 149-160.
- Schug, M.D., Wetterstrand, K.A., Gaudette, M.S., Lim, R.H., Hutter, C.M., Aquatro, C.F. (1998): The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. Molecular Ecology. 7: 57 – 69.
- Smith, H.O., Wilcox, K.W. (1970): A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. Purification and general properties. Journal of Molecular Biotechnology, 51: 379-391.
- Sosinski, B., Douches, D.S. (1996): Polymerase chain reaction based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivar. Hort Sci 31: 130-133.
- Stahlings, R.L., Ford, A.F., Nelson, D., Torney, D.C., Hildebrand, C.E., Moyzis, R.K. (1991): Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. Genomics. 10: 807 – 815.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G.A (1986): Cryptic simplicity in DNA is major source of genetic variation. Nature. 322: 652 – 656.
- Van der Voort, J.N.A.M.R., van Eck, H.J., Draaistra, J., van Zandvoort, P.M.(1998): An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. Molecular Breeding 4:73-77.
- Varshney R.K., Hähnel U., Thiel T., Stein N., Altschmied L., Langridge P., Graner A.(2005): Genetic and physical mapping of genic microsatellites in barley (*Hordeum vulgare* L.) Czech J. Genet. Plant Breed., 41(4): 153-159.
- Vondrejs V., Storchová Z. (1997): genové inženýrství I. – Karolinum, UK – Praha
- Wahls, W.P., Wallace, L.J., Moor P.D.(1990): The Z-DNA motif d(TG)₃₀ promotes reception of information during gene conversion events while stimulating homologous recombination in human cells in culture. Molecular and Cell Biology. 10: 785 – 793.

- Wang, G., Seidmann, M.M., Glazer, P.M.(1996): Mutagenesis in mammalian cells induced by triplete helix formation and transcription.coupled repair. *Science*. 271: 802 -805.
- Watson, J.D. (1980): Rekombinantní DNA genu. *Academia*, 256 – 257.
- Waugh, R. *et al.*(1997): Homology of AFLP products in three mapping populations of barley, *Mol.Gen.Genet* 255:311-321.
- Weber, J.L., May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction.*American Journal of human genetic*. 44: 388 – 396.
- Weber, J.L., Wong, C.(1993): Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*. 2: 1123 – 1128.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990): DNA polymorfisms amplified by arbitraay primers are useful at genetic markers, *Nucleic Acids, res*. 18: 6531-3635.
- Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1993): *Methods Enzymol*. 218: 704-740.

9. Seznam použitých zkratk

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
BBM	Biochemické bílkovinné markery
bp	<i>base pair</i> , pár bází
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementární DNA
dNTP	<i>deoxyribonucleotide</i> , deoxyribonukleotid
ddNTP	<i>dideoxyribonucleotide</i> , dideoxyribonukleotid
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> , denaturační gradientová elektroforéza
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	<i>double strand DNA</i> , dvouvláknová DNA
EDTA	chelaton 3 (disodium ethylendiaminetetraacetate)
ELFO	Elektroforéza
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i> , včleněná tandemová opakování krátkých motivů
kb	<i>kilo base</i> , tisíc bází
PAGE	<i>Polyakrylamide Gel Electrophoresis</i> , polyakrylamidová elektroforéza
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
PCR/RFLP	délkový polymorfismus restričně štěpené amplifikované DNA
PCR-STR	<i>PCR-Single Tagged Site</i> , amplifikace jednoho cílového místa
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i> , lokusy kvantitativních znaků
RAPD	<i>Ramdomly Amplified Polymorphic DNA</i> , polymorfismus náhodně amplifikované DNA
rDNA	ribozomální DNA
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , polymorfismus délky restričních fragmentů
RNA	<i>ribonucleotidic acid</i> , ribonukleová kyselina
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> , konformační polymorfismus jednořetězcové DNA
SSLP	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
SSRs	<i>Simple Sequence Repeats</i> , tandemová opakování krátkých motivů
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i> , tandemová opakování krátkých motivů

